

***Lavandula. stoechas* L. Subsp. *Lavandula. stoechas* Bitkisinde Doku Kültürü Çalışmalarının Optimizasyonu[¥]**

Sam MOKHTARZADEH^{1*}, Khalid Mahmood KHAWAR²

¹Düzce Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Düzce, Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Ankara, Türkiye

*Sorumlu Yazar: sammokhtarzadeh@duzce.edu.tr

Geliş Tarihi: 13.01.2022 Düzeltme Geliş Tarihi: 10.02.2022 Kabul Tarihi: 11.02.2022

Öz

Süs bitkisi olarak da yetişen lavanta bitkisinin farklı türleri uçucu yağ içerdiklerinden dolayı tıp ve kozmetik sanayisinde kullanılmaktadır. Bu bitki gurubunun uçucu yağı dünyada en fazla üretilen 15 uçucu yağdan birisidir. Önemli bir tıbbi ve aromatik bitki olan lavanta'nın türleri generatif ve vejetatif yollar ile çoğaltılabilmektedir. Bu çalışmada tohumların çimlenmesi sonucu elde edilmiş *Lavandula stoechas* bitkisinin kotiledon boğum, meristematik uç, yukardan 1. 2. ve 3. koltuk altı meristem ve epikotil koltuk altı meristem eksplantları farklı dozlarda BAP ve NAA içeren MS besin ortamında sürgün rejenerasyonuna tabi tutulmuş. Denemede eksplant başına ortalama en fazla sürgün sayısı 5.60 adet olarak kotiledon boğum eksplantından ve 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında görülmüştür. Ayrıca elde edilen *Lavandula stoechas* sürgünleri 1.00 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendirilmiş olup, adaptasyonu torfta yapılmış ve tarlaya aktarılmıştır. Çalışma sonucunda Türkiye ve dünya için ekonomik önemi olan *Lavandula stoechas*'in *in vitro* rejenerasyonu, kök oluşumu ve köklenen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu açısından, önemli veriler elde edilmiş olup, çoğaltılmasına yönelik protokol geliştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Lavandula stoechas*, Rejenerasyonu, Köklendirme, Adaptasyon.

Optimization of tissue culture studies in *L. stoechas* L. SUBSP. *L. stoechas*

Abstract

Different types of lavender plant, which also grows as an ornamental plant, are used in medicine and cosmetics industry because they contain essential oil. The essential oil of this plant is one of the 15 most produced essential oils in the world. Lavender, an important medicinal and aromatic plant, can be propagated by generative and vegetative ways. In this study, cotyledon node, meristematic tip, 1st, 2nd and 3rd axillary meristem from above and epicotyl axillary meristem explants of *Lavandula stoechas* were subjected to shoot regeneration in MS nutrient medium containing different concentration of BAP and NAA. In the experiment, the average maximum number of shoots per explant was 5.60 from the cotyledon node explant and in MS medium containing 0.25 mg/l BAP. In addition, the obtained black head shoots were rooted in MS medium containing 1.00 mg/l IBA, their adaptation was made in peat and transferred to the field. As a result of the study, important data were obtained in terms of *in vitro* regeneration, root formation and adaptation of rooting plants to external conditions of *Lavandula stoechas*, which has economic importance for Turkey and the world, and a protocol for its reproduction was developed.

Key words: *Lavandula stoechas*, Regeneration, Rooting, Adaptation

Giriş

Türkiye'de Aydın, Bursa, İstanbul, İzmir ve Muğla illerinde doğal olarak bulunan *Lavandula stoechas* (Karabaş otu) yaprakları kısa saplı ve uzunca tüylü

ve beyazımsı-grimsi-yeşil renktedir. Sivri yaprakları kökten çıkan birkaç dalın üzerinde oluşmakta ve sonradan uzayıp, mor bir çiçeğe dönüşmektedir. Karabaş otu çiçekleri, kara dut meyvesine benzemektedir ve üzerinde sonradan çıkan eflatun

çiçekleri, üzerine konmuş kelebekleri andırmakta olup tohumu açık kahve renklidir. Bu bitkinin çiçekleri ekonomik olarak kullanılmaktadır (Lis-Balchin, 2002). Karabaş otu habitat olarak açık ormanlarda, kuru tepelerde, kireç taşı ve granitli toprakları sevmekte ve çok asidik olmayan topraklarda yetişmektedir. Ayrıca bu bitki sıcak ve kuru ortamları sever, kuraklığa ve soğuğa (-5 °C ile -10 °C) tolerans göstermektedir (Yenici, 1999). Karabaş otu, geleneksel tedavi sisteminde kulak, burun ve boğaz hastalıkları ve idrar yolu hastalıkları tedavisinde kullanılmaktadır. Çiçekli ve yapraklı dallarından karabaş yağı yara iyileştirici özelliğine sahiptir. İkinci yıldan itibaren bu bitkinin taze saplı çiçek verimi 75-150 kg/da, saplı kuru çiçek verimi 35-75 kg/da, sapsız kuru tomurcuk verimi 15-30 kg/da, uçucu yağ verimi 1.5 -3 kg/da ve uçucu yağ oranı %1-2 arasında değişmektedir. Genellikle 50-75 kg/da taze hasat edilmiş saplı lavantadan, distilasyon yapılarak 1 kg kadar yağ elde edilmektedir (Başer 1993, Baydar 2007, Hui vd. 2010).

Bitki ıslahında klasik yöntemleri kullanarak tüm özellikleri bir bitkide toplamak oldukça zor bir işlemdir. *Lavandula stoechas*'da bitki rejenerasyonu ve gen aktarımı genotip ve eksplanttan etkilenmekte olup, gen aktarım oranı oldukça düşüktür (Dronne vd. 1999). Gen transformasyon çalışmalarında başarılı sonuçlar elde etmek için sürgün rejenerasyon sistemlerinin geliştirilmesi çok önemlidir (Calvo ve Segura 1998, Mokhtarzadeh vd. 2011). Bu çalışmada karabaş otu bitkisinde yüksek oranda sürgün rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi, gelişen bitkilerin köklendirilmesi ve dış şartlara adaptasyonunun sağlanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bitki Materyali

Çalışmada kullanılan bitki materyali Prof. Dr. Neşet ARSLAN, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü'nden temin edilmiştir.

Besin Ortamı ve Kültür Koşulları

Yapılan denemelerde 30 g/L sukroz ve 6.5 g/L agar ile karıştırılmış MS ortamı (Murashige ve Skoog 1962) kullanılmıştır. Ortamlar distile edilmiş saf su ile hazırlanmış olup, bitki rejenerasyonu ve sürgünlerin köklendirilmesi için farklı dozlarda bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, IAA, NAA, IBA, GA3 ve Askorbik asit) kullanılmıştır. Besin ortamlarının pH'ı 5.6–5.8'e ayarlanmış olup, otoklavda 118 kPa basınç altında ve 121°C'de 20 dakika bekletilerek steril edilmiştir. Tüm kültürler 20000 lüks beyaz floresan ışığında 16 saat ışık fotoperiyodunda 24°C'de tutulmuştur. Sterilizasyon ve tüm doku

kültürü işlemleri steril kabin içinde yürütülmüştür. Her muamele için, içerisinde 5 adet eksplantın bulunduğu 3 tekerrürlü petri kutuları veya magenta kapları kullanılmıştır. Saf su ve magenta kapları 118 kPa basınç altında ve 121°C'de 20 dakika otoklavlandırılarak steril edilmiştir. Petri kutularının sterilizasyonu için etüv kullanılmış olup kaplar 160°C'de 2 saat bekletilmiştir.

Tohum Canlılık Testi

Deneme başlangıcında canlılık testi yapmak için 200 tohum 1 mg/ml hesabıyla hazırlanmış tetrazoliyom chloride çözeltisi içinde 24 saat karanlıkta bekletilmiş olup tohumların kırmızı rengi incelenerek tohum canlılığı tespit edilmiştir.

Tohumların In vitro Koşullarda Sterilizasyonu ve Çimlendirilmesi

Çalışmada kullanılan *Lavandula stoechas* tohumlarının yüzey sterilizasyonu çamaşır suyunun % 5, 10, 15 ve 20'lik dozu ve her biri 3 farklı sürede (4, 7, 10 dk), oda sıcaklığında yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril saf su ile 5'er dk, 3 kez durulanmıştır. Steril edilmiş olan 200 adet tohum steril petri kapları içerisinde 30 g/L sukroz ve 6.5 g/L agar içeren MS besin ortamında 24±2°C'de 16 saat ışık fotoperiyodunda çimlendirilmiştir.

Eksplant Seçimi

Steril edilmiş olan tohumlarda 5-6 gün sonra çimlenme gözlemlenmiştir. Mikroçoğaltım için elde edilen *Lavandula stoechas* bitkilerinin kotiledon boğum, yukardan birinci, ikinci, üçüncü koltuk altı meristemleri ve meristematik ucu eksplantları alınmıştır.

Eksplantların sürgün rejenerasyonu

Mikroçoğaltım için kullanılan kotiledon boğum, yukardan birinci, ikinci, üçüncü koltuk altı meristemleri ve meristematik ucu eksplantları *In vitro* koşullarda ve farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyiciler içeren MS ortamında rejenerasyona tabi tutulmuştur.

Sürgünlerin Köklendirilmesi

Mikroçoğaltım yolu ile gelişen sürgünler 5-6 cm uzunluğa geldiklerinde kesilerek, steril Magenta kutuları içinde 1.00 mg/L IBA içeren MS ortamda köklendirilmiştir.

Köklenmiş *Lavandula stoechas* Bitkilerin Dış Şartlara adaptasyonu

Denemede köklenen *Lavandula stoechas* sürgünleri 2 saat boyunca 160°C sıcaklıkta steril edilmiş torfa aktarılmıştır. Aktarılan bitkileri korumak için saksılar üzerine şeffaf polietilen torbalar

geçirilerek, bitki adaptasyonu sağlanmıştır. Daha sonra, gelişen bitkiler şeffaf polietilen torbalardan çıkartılmış olup, %45 nem ve oda sıcaklığında 4 hafta büyümeleri takip edilmiştir. Adaptasyonu sağlanmış bitkilerin dış şartlara aktarımı için tarla hazırlıkları yapılmış ve yabancı otlar el ile temizlenmiştir. Tarla hazırlanmasında toprak tırmıkla düz hale getirilip ve çizgili çapa ile 40×40 cm olarak sıra arası ve sıra üstü mesafe düzenlenmiştir. Tarla sulaması ilk 10 gün her akşam ve daha sonra bitkilerin gelişme ve büyümesi dikkate alınarak her 7 günde bir yapılmıştır. Bitkilerin gelişmesini sağlamak ve toprağın havalandırılması için iki haftada bir yabancı ot mücadelesi yapılmıştır.

Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Araştırmadaki rejenerasyon ve köklenme denemeleri 3 tekrarda, tesadüf parseller deneme desenine göre yapılmıştır. Elde edilen verilerin varyans analizi SPSS bilgisayar programı ile yapılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Bitki materyali sterilizasyon için 4, 7, 10 dk süre ve % 5, 10, 15 ve 20 oranda ticari çamaşır suyu kullanılmıştır. Yüze sterilizasyonundan sonra tohumlar steril saf su ile 5'er dk, 3 kez durulanmış olup, 200'er adet tohum steril petri kapları içerisinde 30 g/l şeker ve 6.5 g/l agar içeren MS ortamında 24±2°C'de 16 saat ışık 8 saat karanlık fotoperiyodunda inkübe edilmiştir. İki hafta sonra tohumlar üzerinde gelişen mantar veya bakteri bulaşıklığı ve çimlenme oranı ile ilgili verilerin varyans analizi yapılmıştır (Şekil 1; Çizelge 1).

Lavandula stoechas bitkisinde yapılan ANOVA varyans analizi sonucunda farklı muameleler (uygulama süresi × çamaşır suyu oranı) sonucunda tüm uygulamalar arasında çimlenme oranı bakımından %5 düzeyinde farklılık görülürken, bulaşıklık oranı bakımından her hangi farklılığı gözlemlenmemiştir. Farklılık derecesini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 2'de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi farklı muameleler sonucundan elde edilen çimlenme oranı %46.67–100.00 arasında değişmiştir (Şekil 1). En fazla (%100) çimlenme 7 dk, %20 çamaşır suyu ve 10 dk, %5 çamaşır suyu muamele sonucunda elde edilmiştir. En fazla %40 bulaşık oranı 4 dk, %20 çamaşır suyu ve 10 dk, %10 çamaşır suyu ile sterilizasyon sonucunda görülmüştür. Çizelgede 2'de görüldüğü gibi hem tohumların çimlenmesinde, hem de bulaşıklık oranında bir tutarsızlık görülmektedir. Tutarsızlığın sebebi yüze sterilizasyonundan ziyade, tohumların fizyolojik durumundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Lavandula stoechas bitkisinin tohumlarından bakteri, mantar ve benzeri organizmaların temizlenebilmesi için yüze sterilizasyon yapılmıştır. Tohumların yüze sterilizasyon için en düşük seviyede çamaşır suyu dozu (%5) ve en az süre (5 dk) belirlenmiştir (Bhatti, 2001).

Quazi (1980), iki tür Lavanta (*Lavandula angustifolia* ve *Lavandula latifolia*) bitkisinin sterilizasyonu için, eksplantları %70'lik etanol da 30 saniye bekletilmiş; ayrıca 20 dk, %0.32'lik sodyum hipoklorid ile muamele yaptıktan sonra distile saf suyla durulama yapmıştır.

Kotiledon boğum eksplantından mikroçoğaltım için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri

Mikroçoğaltım amacı ile *in vitro* koşullarda bir haftada çimlenen 10 günlük *Lavandula stoechas* bitkiciklerden elde edilen kotiledon boğum eksplantları farklı oranda BAP ve NAA içeren MS ortamında kültüre alınmış olup, eksplantlar üzerinde 8-12 gün sonra sürgün uçları ve daha sonra sürgün oluşum görülmüştür. Ayrıca, kalluslar oluşumu ilk önce yeşil, sonra kahve yeşil ve daha sonra kahve renkli olarak gözlemlenmiştir. Sekiz hafta sonra elde edilen verilerle yapılmış olan varyans analizi (Çizelge 3) sonuçlarına göre yeşil renkli kallus oluşum oranı ve sürgün oluşum oranı bakımından ortamlar arası %1'lik ve kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı ve eksplant başına ortalama sürgün sayısı bakımından ortamlar arası %5'lik farklılık görülmüştür. Ancak, kahve renkli kallus oluşum oranı ve ortalama sürgün uzunluğu bakımından ortamlar arasında fark bulunmamıştır. Bu denemede farklılık derecesini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 4'de verilmiştir. Sonuçlara göre yeşil renkli kallus oluşum oranı 0-%100.00 arası gözlenmiş olup, en fazla %100 yeşil renkli kallus oluşum oranı 0.75 mg/l BAP ve 0.10 mg/l NAA içeren MS ortamında görülmüştür. Kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı 0-%66.67 arası değişim gözlenmiş olup, en fazla %66.67 kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı 0.25 mg/l BAP ve 0.10 mg/l NAA içeren MS ortamında görülmüştür. Kahve renkli kallus oluşum oranı ise 0-%26.67 arası değişmiştir. Ayrıca, sürgün oluşum oranı 0-%93.34 arası değişmiş olup, en fazla %93.34 sürgün oluşum oranı, 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamlarında görülmüştür (Şekil 2 a,b). Eksplant başına ortalama sürgün sayısı 0-5.60 sürgün arası değişmiştir ve en fazla 5.60 sürgün 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında gözlenmiştir. Ortalama sürgün uzunluğu ise 0.00-1.60 cm arası gözlenmiştir.

Nobre (1996), yaptığı çalışmada, Akdeniz yöresinde bulunan karabaş otu (*Lavandula stoechas*)'nın *in vitro* klonal çoğaltımı için, dış

ortamda yetişmiş bitkilerden alınan koltuk altı meristem eksplantını kullanmıştır. Sonuç olarak, 4–5 hafta sonra sürgün rejenerasyonu 217.2 µM adenine hemisülfat (AdS) ve 0.05 µM NAA içeren Margara N30K tuzları ile oluşan ortamında elde edilmiştir. Portilla vd. (1995), yaptıkları denemede *L. angustifolia*'nın *in vitro* mikroçoğaltımı için koltuk altı meristemleri kullanılmış olup, farklı konsantrasyonda NAA, BA kombinasyonları ve Hindistan cevizi sütü içeren ve içermeyen MS ortamlarında sürgün rejenerasyon elde etmişlerdir. Dias vd. (2002), *Lavandula viridis* bitkisinin koltuk altı meristem eksplantların 0.44 µM BAP içeren MS ortamında mikroçoğaltım yapılmıştır. Eksplant başına en fazla 11.69 adet sürgün 0.67 µM BAP içeren ½ konsantrasyonlu MS ortamında gözlenmiştir.

Meristematik ucu, yukardan 1. 2. ve 3. Koltuk altı meristemi ve epikotil koltuk altı meristemi eksplantından 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında mikroçoğaltımı

Mikroçoğaltım amacıyla *Lavandula stoechas* bitkilerden elde edilen 40 günlük bitkilerden meristematik ucu, yukardan 1. 2. ve 3. koltuk altı meristemi ve epikotil koltukaltı meristem eksplantı 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Eksplantlar üzerinde 7-10 gün sonra sürgün uçları ve daha sonra sürgün oluşum başlamıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen sonuçları varyans analizine tabii tutulmuştur ve Çizelge 5'de verilmiştir. Sonuçlara göre sürgün oluşum oranı bakımından eksplantlar arasında %1 düzeyinde ve ekplant başına ortalama sürgün sayısı bakımından ise eksplantlar arasında %5 düzeyinde farklılık görülmüştür. Ancak, istatistiksel olarak nekrotik kallus oluşum oranı ve kahve yeşil renkli kallus oluşum oranı bakımından her hangi bir farklılık görülmemiştir. Eksplantlar arasında farklılığın önem düzeyini tespit etmek amacıyla Duncan testi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 6'de verilmiştir. Sonuçlara göre kahve-yeşil renkli ve nekrotik kallus oluşum oranı sırasıyla 0-%73.34 ve 0-%40.00 arası görülmüştür. Sürgün oluşum oranı %13.34-80.00 arası değişmiş olup, en fazla %80.00 sürgün oluşumu epikotil koltuk altı meristemi eksplantından elde edilmiştir. Ayrıca, ekplant başına ortalama sürgün sayısı 1.00-5.34 adet arası değişmiştir. Eksplantlar karşılaştırılınca, epikotil koltuk altı meristemi eksplantından en fazla 5.34 adet sürgün elde edilmiştir (Şekil 3). Farklı eksplantlarda ortalama sürgün uzunluğu 0.8-1.29 cm arasında değişmiştir. Nobre (1996), yaptığı çalışmada, Akdeniz yöresinde bulunan karabaş otu (*Lavandula stoechas*)'nın *in vitro* klonal çoğaltımı için dış ortamda yetişmiş bitkilerden alınan koltuk altı meristem eksplantını kullanmıştır. Sonuç olarak, 4–5 hafta sonra sürgün rejenerasyonu

217.2 µM adenine hemisülfat (AdS) ve 0.05 µM NAA içeren Margara N30K tuzları ile oluşan ortamında elde edilmiştir. Andrade vd. (1999) ve Echeverrigaray vd. (2005), sırasıyla *L. angustifolia* bitkisinin boğum ve koltuk altı tomurcuk eksplantından farklı oranda BAP içeren MS ortamında sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir.

Kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirmek için kullanılan farklı dozlarda IBA'nin etkisi

L. stoechas kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi amacı ile eksplantlar farklı oranda IBA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Eksplantlar üzerinde 6-8 gün sonra kök uçları ve daha sonra kök oluşum başlamıştır. Sekiz hafta sonra elde edilen verilerle yapılmış olan varyans analizi sonuçları Çizelge 7'de verilmiştir. Çizelgeye göre kök oluşum oranı, kök uzunluğu ve bitki boyu bakımından ortamlar arasında istatistiksel farklılık görülmemiştir. Çizelge 8'de farklı oranlarda IBA içeren MS ortamından elde edilen kök oluşum oranı %25-75 arası değişmiştir. En fazla %75 kök oluşumu 0.50 ve 1.00 mg/l IBA içeren MS ortamlarında gözlemlenmiştir. Denemede görülen Kök uzunluğu 1.167-1.930 cm arasında meydana gelmiş olup, en uzun kök 1.930 cm olarak 1.00 mg/l IBA içeren MS ortamında görülmüştür. Ayrıca köklenen sürgünlerinin uzunluğu 3.00-5.37 cm arası rapor edilmiş olup, en uzun sürgün uzunluğu 5.37 cm olarak 1.00 IBA içeren MS ortamında görülmüştür (Şekil 4).

Nobre (1996), yaptığı çalışmada, Akdeniz yöresinde bulunan karabaş otu (*Lavandula stoechas*)'nın *in vitro* klonal çoğaltımı için dış ortamda yetişmiş bitkilerden alınan koltuk altı meristem eksplantını kullanmış olup, sürgün rejenerasyonundan elde edilen bitkileri 5.4 µM NAA içeren ortamda köklendirmiştir. Portilla vd. (1995), ise *in vitro* koşullarda elde edilen sürgünleri 0.2-0.4 mg/l-1 IBA içeren ½ oranda MS makro, mikro elementler bulunduran ortamda köklendirmişlerdir.

Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu

Denemede kullanılan 40 bitki torf içerisine aktarılmıştır ve torf bitki şaşırtmak için en uygun ortam olarak değerlendirilmiştir. 160oC sıcaklıkta ve 2 saat süre ile steril edilmiş torfta en iyi gelişimi sağlayan bitkilerin, oda sıcaklığında ve poşet içerisinde gelişmeleri takip edilmiştir. Daha sonra, poşetten çıkartılmış olup, %45 nem ve oda sıcaklığında büyümesini 4 hafta takip ederek, 40 bitkiden 15 bitki tarlaya şaşırtılmıştır (Şekil 5).

İklim odasında gelişen bitkileri tarlaya şaşırtılırken, dikmek amacıyla açılan deliklerin derinlik ve genişlikle beraber toprağının tarla kapasitesinde olduğu kontrol edilmiştir. Bitkiler

diktikten sonra, etrafında buharlaşmayı engellemek için saman örtüsü konulmuştur. İlk 10 gün her akşam verilen su, bitkiler üzerinde olumlu etki yapmış olup ve bitkiler hızlı şekilde büyümeye başlamışlardır. Daha sonra her 7 günde bir sulamanın, bitki gelişiminde herhangi olumlu etkisi görülmemiştir. Benzer şekilde bitkilerin gelişmesini sağlamak ve toprağın havalandırılması için iki haftada bir yabancı ot mücadelesinin de bitkiler üzerinde pozitif etkileri görülmüştür.

In vitro koşullarda geliştirilmiş bitkilerin bir çoğunu seralar veya tarla koşullarında düşük oranda nisbi nem (Brainerd ve Fuchigami 1981), yüksek yoğunlukta ışık ve çevre koşullarından kaynaklanan biyotik ve abiyotik faktörlerin etkisi ile strese girip, yaşamını yitirmektedir (Misra ve Dutta 2001). Bitki doku kültürü çalışmalarında her bitki için adaptasyon şartlar farklı olup, onların seralar ve tarlaya şaşırtmadan önce kullanılacak toprak tipi ve iklim koşullarına adaptasyon ve optimizasyon çok önem taşımaktadır. Bazen *in vitro* koşullarda gelişmiş bitkilerde fotoototrofik yapısının olmadığından adaptasyonda zorluk görünmektedir (Fujiwara vd. 1988). Sonuçta, doku kültürü çalışmalarında her zaman adaptasyona en büyük sorun olarak rastlanmaktadır ve doku kültürü ile çoğaltılmış bitkilerin yaygınlaştırmada bir engel ve güç olarak değerlendirilmektedir. Her bitkiyi

alıştırmak için farklı koşullar gerekebilmektedir, ancak, tüm araştırmacılar, *in vitro* koşullarda geliştirilmiş bitkilerin fizyolojik ve anatomik olarak çok narin olduğundan dış koşullara alıştırmada çalışmalarında bitkilerin şaşırtılmış toprağın uygun olmasını ve yavaş yavaş alıştırmalarının adaptasyonunda etki olduğunu vurgulamaktadırlar (Hazarika 2003). Doku kültür çalışmalarında dış koşullarına adaptasyon büyük bir sorundur ve bazen olumsuz koşullardan dolayı elde edilen bitkilerin dış koşullara adaptasyon sağlamak çok zor olmaktadır. Nobre (1996), yaptığı çalışmada, Akdeniz yöresinde bulunan karabaş otu (*Lavandula stoechas*)'nın *in vitro* klonal çoğaltımı için dış ortamda yetişmiş bitkilerden alınan koltuk altı meristem eksplantından elde edilmiş sürgünleri, 5.4 µM NAA içeren ortamda köklendirmiş olup, %100 adaptasyon sağlamıştır. Tsuro vd. (1999), *Lavandula angustifolia*'nın yaprak eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyon ile elde edilmiş bitkileri IBA içeren ½ MS ortamda köklendirilmiş olup, adaptasyon için sera koşullarında vermikülit kullanmıştır. Falk vd. (2009), 400 adet *Lavandula angustifolia* bitkisinin *in vitro* koşullarda geliştirilmiş olup, dış şartlara adaptasyonunu sağlamak için potting soil/saksı toprağı (organik maddeler, kum, ve perlit) kullanmışlardır.

Çizelge 1. Farklı çamaşır suyu oran ve uygulama süreleri sonucunda *L. stoechas* bitkisi tohumlarının çimlenme ve bulaşıklığı ile ilgili verilerin varyans analizi sonuçları.

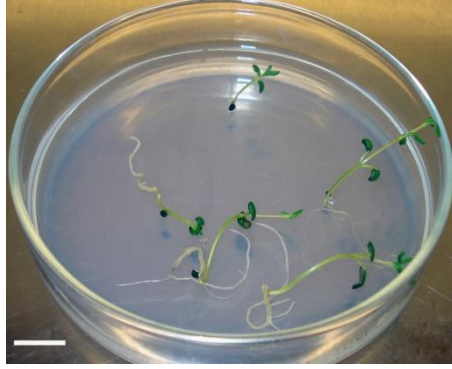
VK	SD	Çimlenme oranı (%)		Bulaşıklığın oranı (%)	
		KO	F	KO	F
Uygulama Süresi x Çamaşır Suyu Oranı	11	1417.17	2.45*	714.14	1.84 ^{bd}
Hata	24	577.78		388.89	
Genel Toplam	35				

* p<0.05 düzeyinde önemlidir

Çizelge 2. Farklı çamaşır suyu oran ve uygulama süreleri sonucunda *L. stoechas* tohumlarının çimlenme ve bulaşıklığı ile ilgili sonuçları.

Muamele		Çimlenme oranı (%)*	Bulaşık oranı (%)
Süre (dk)	Çamaşır suyu oranı (%)		
10	20	80.00 ab	20.00 ab
7	20	100.00 a	0.00 b
4	20	46.67 b	40.00 a
10	15	46.67 b	33.33 ab
7	15	86.67 ab	13.33 ab
4	15	60.00 ab	33.33 ab
10	10	53.33 ab	40.00 a
7	10	46.67 b	26.67 ab
4	10	93.33 ab	0.00 b
10	5	100.00 a	0.00 b
7	5	93.33 ab	6.67 ab
4	5	80.00 ab	20.00 ab

* Aynı sütun daki harfler 0.05 düzeyinde Duncan testine göre farklı grupları göstermektedir

Şekil 1. MS ortamında çimlenen *Lavandula stoechas* tohumları (bar ≈ 1.2 cm).Çizelge 3. *L. stoechas* bitkisinin kotiledon boğum eksplantından mikroçoğaltım için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.

VK	SD	Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve -Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	11	4366.67	14.03**	1135.35	2.92*	487.88	1.16 ^{öd}
Hata	24	311.11		388.89		422.22	
Genel Toplam	35						

VK	SD	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)		Ortalama sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	11	2662.63	4.28**	7.61	2.21*	0.77	1.87 ^{öd}
Hata	24	622.22		3.44		0.41	
Genel Toplam	35						

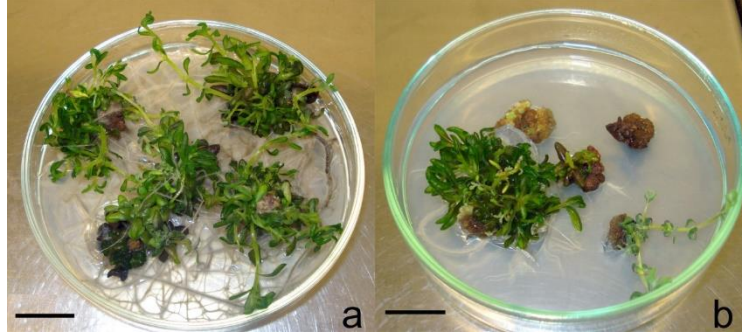
* p<0.05 düzeyinde önemlidir; ** p<0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 4. *L. stoechas* bitkisinin kotiledon boğum eksplantından mikroçoğaltım için kullanılan farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri.

Ortam		Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)**	Kahve Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)*	Kahve renkli kallus oluşum oranı (%)	Sürgün oluşum oranı (%)**	Eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)*	Ortalama sürgün uzunluğu (cm)
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)						
0.25	0.00	0.00 d	6.67 b	0.00	93.34 a	5.60 a	1.60 a
0.25	0.05	13.34 d	0.00 b	20.00	66.67 ab	1.67 b	1.19 abc
0.25	0.10	0.00 d	66.67 a	33.34	0.00 e	0.00 b	0.00 c
0.50	0.00	86.67 a	0.00 b	0.00	13.34 cde	2.67 ab	1.09 abc
0.50	0.05	26.67 cd	0.00 b	20.00	53.34 abcd	3.56 ab	1.32 ab
0.50	0.10	20.00 cd	20.00 b	0.00	60.00 abc	2.39 ab	1.10 abc
0.75	0.00	46.67 bc	0.00 b	26.67	26.67 bcde	2.37 ab	0.67 abc
0.75	0.05	66.67 ab	0.00 b	0.00	33.34 bcde	0.67 b	0.67 abc
0.75	0.10	100.00 a	0.00 b	0.00	0.00 e	0.00 b	0.00 c
1.00	0.00	80.00 a	0.00 b	0.00	20.00 bcde	1.67 b	0.67 abc
1.00	0.05	93.34 a	0.00 b	0.00	6.67 de	1.00 b	0.34 bc
1.00	0.10	86.67 a	0.00 b	0.00	13.34 cde	1.00 b	1.00 abc

* Aynı sütun daki harfler 0.05 düzeyinde Duncan testine göre farklı grupları göstermektedir

** Aynı sütun daki harfler 0.01 düzeyinde Duncan testine göre farklı grupları göstermektedir



Şekil 2. Kotiledon boğum eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için farklı BAP ve NAA dozlarının etkileri, (a) 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında *Lavandula stoechas* bitkisinde kotiledon boğum eksplantı üzerinde sürgün oluşumu ve (b) 0.75 mg/l BAP içeren MS ortamında sürgün ve kahve kallus oluşumu (bar a, b ≈2.5 cm).

Çizelge 5. *L. stoechas* bitkisinin meristematik ucu, yukardan 1, 2. ve 3. koltuk altı meristemi ve epikotil koltuk altı meristemi eksplantlarından 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamındaki mikroçoğaltım ile ilgili verilerin varyans analiz sonuçları.

VK	SD	Kahve-Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)		Nekrotik kallus oluşum oranı (%)		Sürgün oluşum oranı (%)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Eksplantlar	4	2160.00	3.11 ^{bd}	666.67	1.25 ^{bd}	2626.67	24.62 ^{**}
Hata	10	693.33		533.33		106.67	
Genel Toplam	14						
VK	SD	Explant başına ortalama sürgün sayısı (adet)		Ortalama sürgün uzunluğu (cm)			
		KO	F	KO	F		
Eksplantlar	4	7.78	4.14 [*]	0.12	0.91 ^{bd}		
Hata	10	1.88		0.13			
Genel Toplam	14						

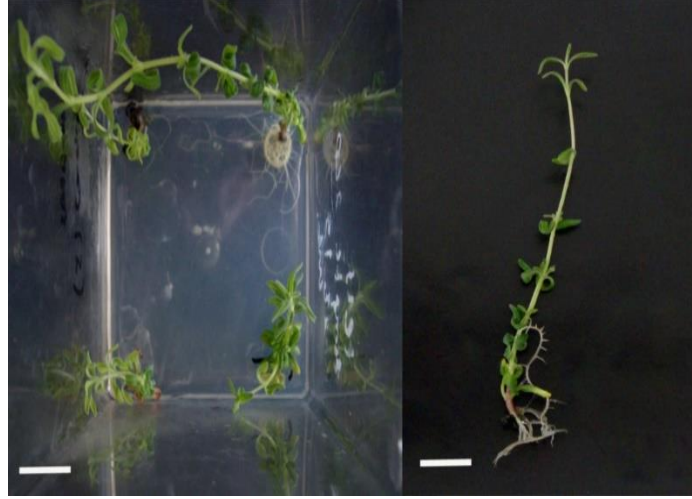
* p<0.05 düzeyinde önemlidir; ** p<0.01 düzeyinde önemlidir

Çizelge 6. *L. stoechas* bitkisinin meristematik ucu, yukardan 1, 2. ve 3. koltuk altı meristemi ve epikotil koltuk altı meristemi eksplantından 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamındaki mikroçoğaltım sonuçları.

Ortam	BAP	Kahve Yeşil renkli kallus oluşum oranı (%)	Nekrotik kallus oluşum oranı (%)	Sürgün oluşum oranı (%)**	Explant başına ortalama sürgün sayısı (adet)*	Ortalama sürgün uzunluğu (cm)
Meristematik uç	0.25	40.00 ab	0.00	60.00 a	3.05 ab	1.24
Yukardan 1. Koltuk altı meristemi	0.25	40.00 ab	40.00	20.00 c	3.00 ab	1.00
Yukardan 2. koltuk altı meristemi	0.25	73.34 a	13.34	13.34 c	2.00 b	0.80
Yukardan 3. koltuk altı meristemi	0.25	53.34 a	26.64	20.00 c	1.00 b	1.00
Epikotil koltuk altı meristemi	0.25	0.00 b	20.00	80.00 a	5.34 a	1.29

* Aynı sütun daki harfler 0.05 düzeyinde Duncan testine göre farklı grupları göstermektedir

** Aynı sütun daki harfler 0.01 düzeyinde Duncan testine göre farklı grupları göstermektedir



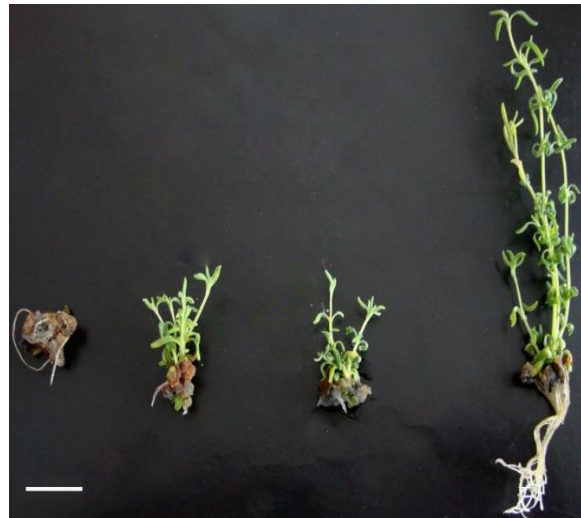
Şekil 3. Meristematik ucu, yukardan 1., 2. ve 3. Koltuk altı meristemi ve epikotil koltuk altı meristemi eksplantından 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamda mikroçoğaltım (bar ≈1 cm).

Çizelge 7. *Lavandula stoechas* kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünleri köklendirmek için kullanılan farklı IBA dozlarının etkilerini belirlemek amacıyla yapılan varyans analiz sonuçları.

VK	SD	Kök oluşum oranı (%)		Kök uzunluğu (cm)		Bitki boyu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Ortam	3	1875.00	2.77 ^{öd}	0.32	0.58 ^{öd}	2.82	0.73 ^{öd}
Hata	8	677.00		0.55		3.87	
Genel Toplam	11						

Çizelge 8. *L. stoechas* kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünleri köklendirmek için kullanılan farklı IBA dozlarının etkileri.

Ortam	Kök oluşum oranı (%)	Kök uzunluğu (cm)	bitki boyu (cm)
IBA (mg/l)			
0.25	41.66	1.62	4.11
0.50	75.00	1.40	4.06
0.75	25.00	1.17	3.00
1.00	75.00	1.93	5.37



Şekil 4. Kotiledon boğum eksplantından elde edilen sürgünlerin köklendirmek üzerine farklı dozlarda IBA'nin etkisi, köklendirilen *Lavandula stoechas* bitkileri (bar ≈1 cm).



Şekil 5. Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu, tarladaki *Lavandula stoechas* bitkileri.

Sonuç ve Öneriler

Doku kültürü çalışmalarında sterilizasyon, çimlenmeyi doğrudan etkilemekte olup, önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmalarda *Lavandula stoechas* için 7 dk, %20 çamaşır suyu ile sterilizasyon uygun görülmüştür. Ayrıca denemede kotiledon boğum, meristemik ucu, yukardan 1. 2. ve 3. koltuk altı meristem ve epikotil koltuk altı meristem eksplantları kullanılmış ve yüksek oranda sürgün rejenerasyon sağlanmıştır. Sürgün rejenerasyonu ve deneme süresi bakımından en iyi eksplant kotiledon boğum olduğu gözlemlenmiştir. Daha sonra elde edilen *Lavandula stoechas* sürgünlerinin köklendirilmesi 1.00 mg/l IBA içeren MS ortamında yapılmıştır. Bitki doku kültürü çalışmalarında her bitki için adaptasyon şartları farklı olup, onların sera ve tarlaya şaşırtmadan önce kullanılacak toprak tipi ve iklim koşullarına adaptasyon optimizasyonu çok önem taşımaktadır. Ayrıca, doku kültür çalışmalarında elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyon sağlamsı çok zor bir süreçtir. Çalışmada, *in vitro* koşullarında geliştirilmiş bitkiler, Mayıs ve Eylül ayları arası tarlaya şaşırtılmıştır. Sonuç olarak Türkiye ve dünya için ekonomik önemi olan *Lavandula stoechas*'in *in vitro* sürgün ve kök oluşumu ve daha sonra elde edilen bitkilerin *ex vitro* adaptasyonu açısından, önemli bulgular elde edilmiş olup, bitkilerin çoğaltılmasına yönelik protokol optimize edilmiştir. Bu protokol dan yola çıkarak diğer Lamiaceae familyasına ait tıbbi ve aromatik bitkilerde yapılacak doku kültürü ve gen aktarımı çalışmalarında kullanılması ile olumlu sonuçlara varılacağı inanılmaktadır.

¥Bu çalışma doktora tezinden üretilmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Kaynaklar

- Andrade, L.B. Echeverrigaray, S. Fracaro, F. Pauletti, G.F and Rota, L. 1999. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). Plant cell, Tissue and organ culture, 56: 79-83.
- Başer, K.H.C. 1993. Essential Oils of Anatolian Lamiaceae: A. Profile. Acta Hort, 333: 217-238.
- Baydar, H. 2007. Tıbbi, aromatik ve keyif bitkileri bilimi ve teknolojisi (Genişletilmiş II baskı). Süleyman Demirel Üniversitesi (ziraat fakültesi), 51: 205– 212.
- Bhatti, K. M. K. 2001. Mercimek (*Lens culinaris* Medik.)'te Doku Kültürü Çalışmaları ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, YÖK Tez No: 120164, Ankara.
- Brainerd, K.E and Fuchigami, L.H. 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low humidity. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 106: 515–518.

- Calvo, M.C and Segura, J. 1988. *In vitro* morphogenesis from explants of *Lavandula latifolia* and *Lavandula stoechas* seedlings. *Sci Hortic-Amsterdam*, 36: 131-137.
- Dias, M.C., Almeida, R and Romano, A. 2002. Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'Hér through *in vitro* axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68:99-102.
- Dronne, S. Moja, S. Jullien, F. Berger, F and Caissard, J.C. 1999. Agrobacterium mediated transformation of lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur). *Kluwer Academic Publishers*, 8: 335–347.
- Echeverrigaray, S. Basso, R and Andrade, L. 2005. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. *Biologia Plantarum*, 49: 439-442.
- Falk, L. Biswas, K. Boeckelmann, A. Lane, A and Mahmoud, S.S. 2009. An efficient method for the micropropagation of lavenders regeneration of a unique mutant. *Journal of essential oil research*, 21: 225-228.
- Fujiwara, K. Kozai, T and Watanabe, I. 1988. Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and acclimatization stage. *Acta Hortic*, 230:153–158.
- Hazarika, B.N. 2003. Acclimatization of tissue cultured plant. *Current Science*, 85 (12): 1704-1712.
- Hui, L. He, L. Huan, L. XiaoLan, L and Aiguo, Z. 2010. Chemical composition of lavender essential oil and its antioxidant activity and inhibition against rhinitisrelated bacteria. *Afr J Microbiol Res*, 4: 309-313.
- Lis-Balchin, M. 2002. *Lavender*. Taylor & Francis, 283 p.
- Misra, P and Dutta, S.K. 2001. Acclimatization of Asiatic hybrid lilies under stress condition after propagation through tissue culture. *Curr. Sci*, 81:1530-1533.
- Mokhtarzadeh, S. Khawar, K.M ve Ozcan, S. 2011. Karabaş otu (*Lavandula stoechas* L.)'nin *in vitro* mikroçoğaltımı. Uluslararası katılımlı 1. ali numan kıraç tarım kongresi ve fuarı, 3: 2689-2692.
- Murashige, T and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Nobre, J. 1996. *In vitro* cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from fieldgrown plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 46:151-155.
- Portilla, G. Eltran, J.B and Vega, A. 1995. Micropropagation of lavender (*Lavandula angustifolia*) from axillary buds. *Investigacion Agricola*, 15: 55-60.
- Quazi, M.H. 1980. *In vitro* multiplication of *Lavandula* spp. *Ann Bot*, 45:361- 362.
- Tsuro, M. Ikedo, H and Kato, H. 2009. Efficient genetic transformation in lavandin using Agrobacterium rhizogenes as vector. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 78: 236-241.
- Yenici, N. 1999. *Lavandula stoechas* bitkisinin özellikleri ve fibrinolitik sisteme etkisinin araştırılması yüksek lisans tezi. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 37 s.